

Aus der Dermatologischen Klinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. O. Hornstein

Untersuchungen über das Verhalten menschlicher Spermatozoen bei langsamer und schneller Zentrifugation

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Rudolf Dorn
aus Amberg

Aus der Dermatologischen Klinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. O. Hornstein

Untersuchungen über das Verhalten menschlicher Spermatozoen bei langsamer und schneller Zentrifugation

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Rudolf Dorn

aus Amberg

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Priv.-Doz. Dr. N. Hofmann

Korreferent: Prof. Dr. O. P. Hornstein

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Februar 1976

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

Herrn Prof. Dr. O. Hornstein danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Priv.-Doz. Dr. N. Hofmann habe ich sehr zu danken für die unermüdliche Hilfestellung bei der Bearbeitung des Themas.

Fräulein Zieglwallner bin ich dankbar für die technische Beratung bei der Durchführung der Versuche.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>EIGENE FRAGESTELLUNG</u>	3
3. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	4
3.1. Versuchsablauf	4
3.2. Zentrifugation	8
4. <u>ERGEBNISSE</u>	10
4.1. Häufigkeitsverteilung der spermatologischen und klinisch-andrologischen Befunde	10
4.2. Versuchsergebnisse Motilität. Analyse des Sedimentierungseffektes durch Zentrifugation mit 179 g und 1610 g.	13
4.3. Versuchsergebnisse Konzentration. Analyse des Sedimentierungseffektes durch Vergleich der Überstands- und Sediments- konzentrationen der Nativproben mit den formalinbehandelten Proben.	22
5. <u>STATISTIK</u>	28
6. <u>DISKUSSION</u>	32
7. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	35
8. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	37

1. EINLEITUNG

Menschliche Spermatozoen werden bei der Zentrifugation entsprechend der Umlaufgeschwindigkeit bzw. der Gravitationskonstanten g im Sediment konzentriert.

BODENSTEIN und HOFMANN haben bei den Gravitationswerten g 46, 179, 403, 617, 1118, 1610 entsprechend 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 U./min. Spermaproben unterschiedlicher Spermadichte zentrifugiert. Dabei wurde im Sediment eine zunehmende Konzentrierung und im Überstand eine zunehmende Dilution festgestellt, wobei die Zunahme bzw. der Abfall nicht linear, sondern in Form einer Hyperbel bzw. Parabel erfolgte.

Ausgehend von den Beobachtungen von T.H. MANN sowie HARRISON und WHITE, daß lebende Spermatozoen durch den Zentrifugationsvorgang geschädigt werden, war von BODENSTEIN und HOFMANN auf den jeweiligen Zentrifugationsstufen die Motilität der Sediment- und der Überstandsspermatozoen bestimmt worden. Die Resultate wurden mit der Ausgangsmotilität verglichen. Dabei zeigte sich, daß mit zunehmenden Zentrifugationsgeschwindigkeiten eindeutiger Motilitätsverlust eintritt, bei niederen Zentrifugationsgeschwindigkeiten von 46 - 403 g entsprechend 500 - 1500 Upm eine verbesserte Motilität der Sedimentsspermatozoen gefunden wurde. Eine ähnliche Beobachtung war von BRANHAM bei Zentrifugationsversuchen an Spermatozoen der *Abatia* Spezies gemacht worden.

Dieses Phänomen läßt sich lediglich so interpretieren, daß bei den genannten niedrigen Zentrifugationsgeschwindigkeiten die Eigenmotilität einen selektionierenden Faktor darstellt, d.h. die besser motilen Spermatozoen werden gegenüber den weniger motilen durch ihre Eigenmotilität stärker in das Sediment gelangen. Bei hohen Umlaufgeschwindigkeiten ist dann das Gravitationsfeld so stark, daß sich dieser Selektionierungsvorgang nicht mehr bemerkbar machen kann.

BRANHAM hatte den positiven Geotropismus von lebenden Spermatozoen dadurch nachgewiesen, daß er Spermatozoensuspensionen mit 0,02 %iger Formalinlösung abtötete und diese bei der Zentrifugation gegenüber den Nativproben verglich.

2. EIGENE FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden experimentellen Arbeit haben wir uns zur Aufgabe gestellt, den von BODENSTEIN und HOF-MANN nachgewiesenen Selektionierungseffekt gut motiler Spermatozoen durch Zentrifugation bei 179 g hinsichtlich der pathophysiologischen Grundlagen zu analysieren. Zu diesem Zweck mußte die Probenzahl erhöht werden; weiterhin sollte in Anlehnung an eine von BRANHAM mitgeteilte Versuchsanordnung des Konzentrationsvergleichs zentrifugierter Nativproben mit zentrifugierten formalinbehandelten Proben überprüft werden, ob der Selektionierung pathophysiologisch die Eigenmotilität der Spermatozoen durch einen positiven Geotropismus im Zentrifugationsfeld zugrunde liegt.

Der Selektionierungseffekt sollte darüberhinaus auf die zugrundeliegenden spermatologischen Parameter von Zahl, Motilität und Morphologie differenziert werden. In gleicher Weise sollte der Schädigungseffekt hinsichtlich der drei spermatologischen Grundparameter analysiert werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Versuchsablauf

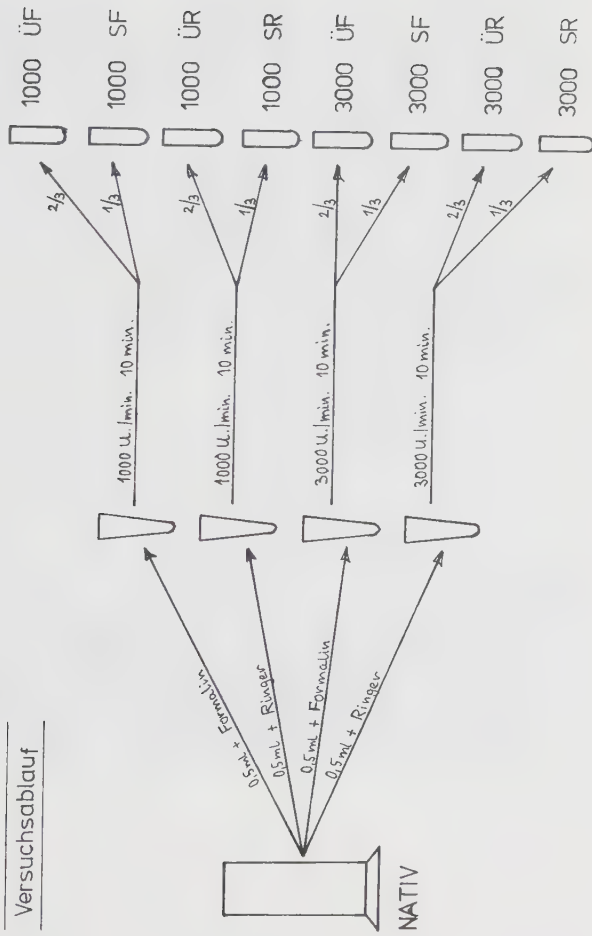
Zur Untersuchung gelangten insgesamt dreißig Spermaproben. Es handelte sich dabei um Proben von Patienten der andrologischen Sprechstunde der dermatologischen Universitätsklinik Erlangen und zum Teil um gesunde fertile Probanden.

Das Sperma wurde durch Masturbation bei fünftägiger Karenz in der Klinik gewonnen. Es wurde in einem sterilen kalibrierten Gefäß aufgefangen und geschützt vor Licht bis zur vollständigen Verflüssigung im Brutschrank bei 37 ° Celsius aufbewahrt.

Nach eingetretener Verflüssigung wurden folgende Versuchsanordnungen angewandt:

Siehe Seite 5.

Versuchsablauf



Die Voraussetzung für eine vollständige Durchführung eines Versuches war eine Nativspermamenge von mindestens 3,5 ml.

Zur Bestimmung der Motilität wurde mit Hilfe einer Pipette ein Tropfen Spermaflüssigkeit auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas versehen. Unter einem Mikroskop wurde dann die quantitative Motilität von 300 Spermatozoen durch Auszählen bestimmt.

Zur Konzentrationsermittlung wurde 0,1 ml Sperma mit 1,7 ml physiologischer Kochsalzlösung und 0,2 ml Aethanol verdünnt. Die Auszählung erfolgte in einer Zeiss-Thoma-Zählkammer unter dem Mikroskop.

Die Umrechnung auf die Zahl der Spermatozoen pro ml zeigt folgende Aufstellung:

Verdünnung	1 : 20
Fläche der Kammer	$1/400 \text{ mm}^2$
Höhe der Kammer	$1/10 \text{ mm}$
Zahl der Einzelquadrate	
der Kammer	256

Somit lautet die Umrechnungsformel:

$$\text{Anzahl der Spermien/ml} = \frac{\text{Zahl d. Spermatozoen} \times 80\,000\,000}{256}$$

In einem ersten Arbeitsgang wurden zunächst die Nativmotilität und die Ausgangskonzentration bestimmt.

Dann wurden mit einer geeichten Pipette je 0,5 ml Spermaflüssigkeit in vier kalibrierte Nisselröhrchen eingebracht. Zwei dieser Proben wurde zur Immobilisierung der Spermatozoen je 1 Tropfen 0,02 %ige Formalinlösung beigegeben, während die anderen beiden mit je einem Tropfen Ringerlösung versetzt wurden. Je eine mit Ringer- und eine mit Formalinlösung versetzte Probe wurde dann in der Zentrifuge 10 Minuten bei 1000 U/min. = 179 g geschleudert. Anschließend wurden beide Proben nach Überstand und Sediment getrennt, wobei der Überstand als 2/3 und das Sediment als 1/3 der Probe definiert wurde.

Überstand und Sediment beider Proben wurden nun hinsichtlich ihrer quantitativen Motilität und ihrer Konzentration unter dem Mikroskop ausgezählt.

Derselbe Versuch wurde mit den noch verbliebenen Ringer- und Formalinproben wiederholt, wobei jedoch diesmal die Zentrifugationsgeschwindigkeit 3000 U/min. = 1607 g betrug.

Die meisten Proben wurden darüberhinaus im andrologischen Labor der Klinik nach dem üblichen Standardprogramm analysiert, so daß eine genaue spermatologische Beurteilung gegeben werden konnte. Die andrologische Untersuchung erfolgte in der andrologischen Sprechstunde, dort wurde im Zusammenhang mit den spermatologischen Befunden die klinische Diagnose festgelegt.

3.2. Zentrifugation

Die Erde hat um sich herum ein Gravitationsfeld. Die Beschleunigung, die eine in dieses Gravitationsfeld gebrachte Masse erfährt, beträgt

$$g = 9.81 \frac{\text{m}}{\text{sec}^2}$$

In einer Flüssigkeit gelöste Teilchen sinken infolge der Gravitation allmählich zu Boden, falls ihre Dichte die der Flüssigkeit übertrifft. Diese Sedimentation vollzieht sich infolge der Flüssigkeitsreibung umso langsamer je kleiner einerseits die Teilchen und je geringer andererseits der Dichteunterschied ist. Bringt man die Flüssigkeit in eine Zentrifuge ein und versetzt sie in schnelle Rotation, so setzt man das Material Zentrifugalkräften aus, die die Erdgravitation um ein Vielfaches übertreffen.

Die Zentrifugalkraft entsteht, weil bewegte Körper auf Grund ihrer trägen Masse der Bewegung auf der Kreisbahn den bekannten Trägheitswiderstand entgegensetzen. Die Zentrifugalkraft ist also eine Trägheitskraft, die am Drehzentrum angreifend nach außen wirkt. Ihr entgegengerichtet und von gleicher Größe tritt stets gleichzeitig die Zentripetalkraft auf. Diese ist auf das Drehzentrum gerichtet und zwingt dadurch den Körper die Kreisbahn zu durchlaufen.

Die Zentrifugalkraft gehorcht der Gesetzmäßigkeit

$$F = m \cdot \omega^2 \cdot r$$

Wobei

m = Masse

ω = Winkelgeschwindigkeit

r = Radius

ist.

Sie wird also bei gegebener Masse und festem Radius umso größer, je höher die Winkelgeschwindigkeit, d.h. bei der Zentrifuge die Umdrehungen pro Minute sind.

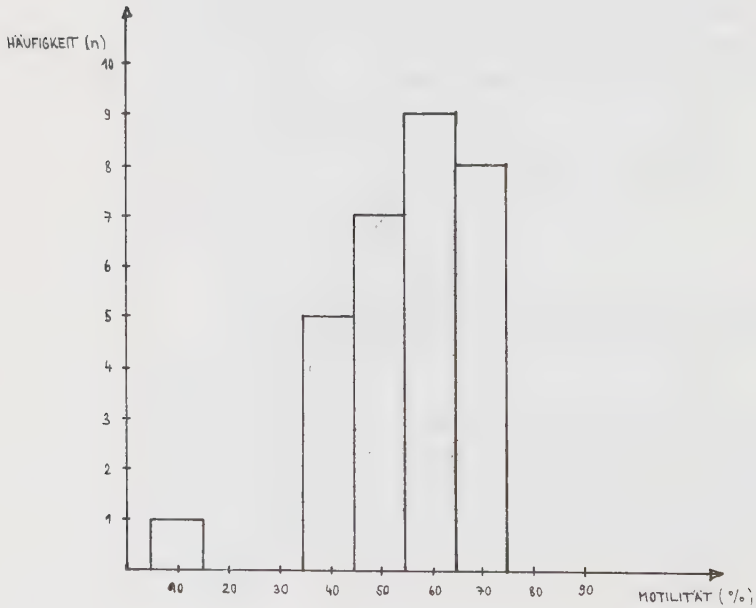
Bei der im Versuch verwendeten Zentrifuge betrug g bei

1000 U/min. $179 \frac{m}{sec^2}$ und bei

3000 U/min. $1610 \frac{m}{sec^2}$.

4. ERGEBNISSE

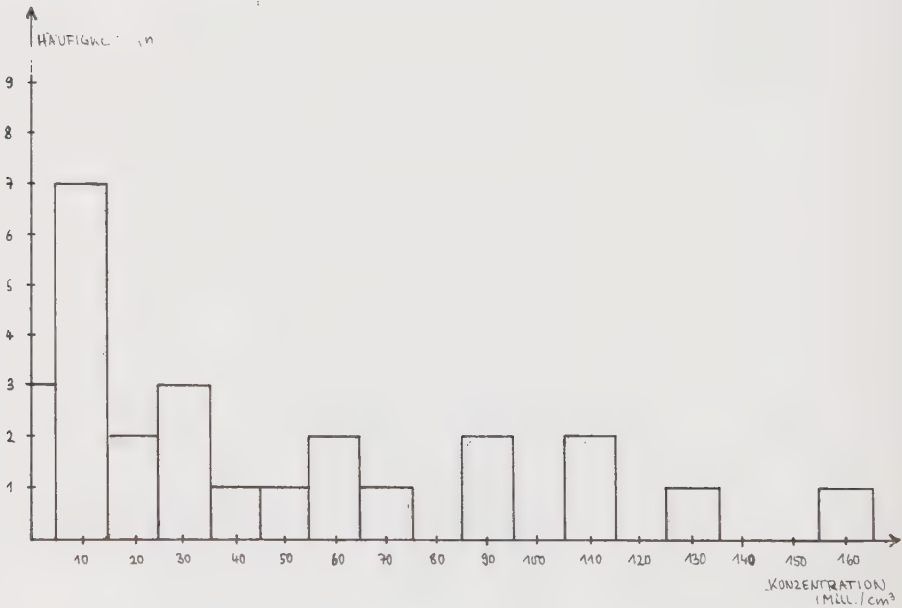
4.1. Häufigkeitsverteilung der spermatologischen und klinisch-andrologischen Befunde.



Verteilung der Nativmotilitäten

Die quantitative Motilität, d.h. der Prozentanteil motiler Spermatozoen auf die Gesamtzahl der Spermatozoen weist Werte zwischen 13 und 72 % auf. Die Mehrzahl der Proben liegt im Bereich von 50 - 70 % Motilität.

Verteilung der Nativkonzentrationen



Die Konzentrationen liegen zwischen 0,9 und 161 Mill./ml, wobei jedoch im Gegensatz zum Parameter der quantitativen Motilität eine breite Streuung gegeben ist, mit Ausnahme einer Häufung im Bereich stark eingeschränkter Spermakonzentrationen.

4.2. Versuchsergebnisse Motilität. Analyse des
Sedimentierungseffektes durch Zentrifugation
mit 179 g und 1610 g.

Die Nativspermaproben wurden sowohl durch Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen/min., als auch bei 3000 Umdrehungen/min. nach Überstand und Sediment getrennt.

Dabei fanden sich folgende Ergebnisse:

Siehe Seite 14.

	Nativ	1000 ü	1000 s	3000 ü	3000 s
1.	65	47	1	41	42
2.	57	28	55	2	33
3.	55	40	59	29	30
4.	65	42	72	34	45
5.	66	4	73	0	44
6.	72	67	75	0	47
7.	60	48	56	0	34
8.	55	54	42	23	20
9.	63	56	68	36	39
10.	73	56	79	9	51
11.	56	50	65	29	37
12.	72	59	74	29	51
13.	51	31	61	0	44
14.	51	31	57	0	24
15.	39	11	51	0	27
16.	13	3	16	0	10
17.	41	17	46	15	27
18.	55	18	51	0	45
19.	57	20	58	19	28
20.	66	44	73	40	46
21.	67	59	71	24	51
22.	63	30	65	18	50
23.	54	25	61	0	23
24.	66	37	70	0	32
25.	61	46	61	0	38
26.	44	26	52	15	31
27.	57	18	56	0	17
28.	70	28	82	21	34
29.	40	17	35	11	16
30.	47	25	32	11	26
M	56.0	35.8	59.6	13.5	34.7

M = Mittelwert

Die Ausgangsmotilität liegt in 14 Fällen über 60 % und in 16 Fällen darunter. Die statistische Berechnung des Klassenmittels zeigt im Sediment bei Zentrifugation mit 1000 U/min. eine bessere Motilität als in der Nativprobe auf, während sich im Überstand nach Zentrifugation mit 1000 U/min. eine wesentlich schlechtere Motilität nachweisen ließ.

Nach Zentrifugation mit 3000 U/min. findet sich insgesamt eine Verschlechterung, die aber im Überstand deutlicher ausgeprägt ist als im Sediment. Lediglich bei 6 Proben wurde der Selektionierungseffekt nicht beobachtet.

Das Motilitätsverhalten der Spermaproben stellt sich als prozentualer Relativwert bezogen auf die Ausgangsmotilität folgendermaßen dar:

Siehe Seite 16.

	Nativ	1000 ü	1000 s	3000 ü	3000 s
1.	100	72	107	63	64
2.	100	75	148	5	89
3.	100	72	107	52	54
4.	100	66	112	52	69
5.	100	62	110	0	66
6.	100	93	104	0	65
7.	100	80	93	0	56
8.	100	98	76	41	36
9.	100	88	107	57	61
10.	100	76	108	12	69
11.	100	89	116	51	66
12.	100	81	102	40	70
13.	100	60	119	0	86
14.	100	60	111	0	47
15.	100	28	130	0	69
16.	100	23	123	0	76
17.	100	41	112	36	65
18.	100	32	92	0	81
19.	100	35	101	33	49
20.	100	66	110	60	69
21.	100	88	105	35	76
22.	100	47	103	28	79
23.	100	46	112	0	42
24.	100	56	106	0	48
25.	100	75	100	0	62
26.	100	59	118	34	70
27.	100	31	98	0	29
28.	100	40	117	30	48
29.	100	42	87	27	40
30.	100	53	68	23	55
M	100	61.1	106.7	22.6	61.9
=====					

Beurteilung:

In der Klasse der gestörten Motilität ist auffallenderweise der Selektionierungseffekt etwas deutlicher ausgeprägt, während die Überstandsspermatozoen eine stärkere Motilitätseinbuße aufweisen als diejenigen der normalen Motilitätsklasse, d.h. die Überstandsspermatozoen erleiden bei vorgegebener schlechter Motilität durch Zentrifugation mit 1000 U./min. eine stärkere Motilitätseinbuße verglichen mit den Proben einer normalen Motilität.

Nach Zentrifugation mit 3000 U./min. sind die Sedimentspermatozoen in der Klasse der gestörten Motilität weniger mobil als in der Klasse der normalen Motilität und die Überstandsspermatozoen analog deutlicher geschädigt.

Die Motilität zeigt in der Korrelation zu den Dichteklassen der Spermatozoen folgendes Verhalten:

Siehe Seite 18 bis 20.

- a) Spermaproben mit einer Ausgangskonzentration von
0,1 - 20 Mill. Spermatozoen pro Milliliter:

	Nativ	1000 Ü	1000 S	3000 Ü	3000 S
2.	100	75	148	5	89
3.	100	72	107	52	54
7.	100	80	93	0	56
13.	100	60	119	0	86
14.	100	60	111	0	47
15.	100	28	130	0	69
16.	100	23	123	0	76
18.	100	32	92	0	81
23.	100	46	112	0	42
27.	100	31	98	0	29
29.	100	42	87	27	40
M	100	49.9	110.9	7.6	60.8

Veränderungen in Prozent bezogen auf die Ausgangs-
 motilität.

- b) Spermaproben mit einer Ausgangskonzentration von 20,1 - 40 Mill. Spermatozoen pro Milliliter:

	Nativ	1000 ü	1000 s	3000 ü	3000 s
5.	100	62	110	0	66
6.	100	93	104	0	65
17.	100	41	112	36	65
20.	100	66	110	60	69
22.	100	47	103	28	79
26.	100	59	118	34	70
M	100	61.3	109.5	26.3	69.0
=====					

Veränderungen in Prozent bezogen auf die Ausgangsmotilität.

- c) Spermaproben mit einer Ausgangskonzentration von
40,1 - 161,0 Mill. Spermatozoen pro Milliliter:

	Nativ	1000 U	1000 S	3000 U	3000 S
4.	100	66	112	52	69
8.	100	98	76	41	36
10.	100	76	108	12	69
11.	100	89	116	51	66
12.	100	81	102	40	70
19.	100	35	101	33	49
21.	100	88	105	35	76
24.	100	56	106	0	48
25.	100	75	100	0	62
28.	100	40	117	30	48
30.	100	53	68	23	55
M	100	68.8	101.0	28.8	58.9

Veränderungen in Prozent bezogen auf die Ausgangs-
 motilität.

Beurteilung:

Der Selektionierungseffekt ist am deutlichsten in der Klasse der stark eingeschränkten Spermatozoendichte ausgeprägt. Hier findet sich nach Zentrifugation mit 1000 U./min. eine Relation der Sediment- zu den Überstandsspermatozoen von 110.9 %/49.9 % (bezogen auf die Nativmotilität $\hat{=}$ 100 %) gegenüber 109. %/61.3 % bei vorgegebener mittlerer bis geringer Einschränkung der Spermatozoendichte, sowie von 101.0 %/68.8 % in der Klasse der normalen Spermatozoendichte, d.h. mit zunehmender Dichte prägt sich der Selektionierungseffekt geringer aus, während die Überstandsspermatozoen mit abnehmender Dichte zunehmend geschädigt werden.

Bei Zentrifugation mit 3000 U./min. verhält sich die Schädigung der Sedimentspermatozoen annähernd gleich, jedenfalls läßt sich keine Reihe feststellen, während im Überstand eine deutliche Verschlechterung mit abnehmender Ausgangskonzentration zu beobachten war.

4.3. Analyse des Sedimentierungseffektes durch Vergleich der Überstands- und Sedimentkonzentration der Nativproben mit den formalinbehandelten Proben.

Zur Analyse des Sedimentierungseffektes wurden nach Zentrifugation mit 1000 bzw. 3000 U./min. eine formalinimmobilisierte mit einer mit Ringerlösung versetzte Probe, beide getrennt nach Überstand und Sediment, hinsichtlich ihrer Konzentration verglichen.

Versuchsergebnisse Konzentration

Absolute Werte in Mill./ml

- siehe Seite 23 -.

Versuchsergebnisse Konzentration

Relative Werte in %, bezogen auf die Nativkonzentration

- siehe Seite 24 -.

	NATIV	1000 ÜR	1000 ÜF	1000 SR	1000 SF	3000 ÜR	3000 ÜF	3000 SR	3000 SF
1.									
2.	5,3								
3.	18,4								
4.	114,0								
5.	30,6								
6.	37,0								
7.	7,8								
8.	64,5								
9.				34,6				130,0	
10.	52,1	25,6	31,8	80,3	71,9	1,9	8,5	102,0	98,0
11.	161,0	86,2	104,0	251,0	218,0	14,2	16,0	322,0	307,0
12.	126,0	43,8	50,2	226,0	173,0	3,1	4,4	276,0	271,0
13.	13,4	7,8	11,0	34,4	26,2	0,6	0,9	37,9	31,8
14.	5,1	3,4	3,8	8,7	7,2	0,3	0,3	11,9	10,6
15.	0,9	0	0	1,9	1,6	0	0	2,2	2,2
16.	2,2	0,3	0,3	4,7	4,4	0	0	5,3	4,7
17.	22,6	8,2	8,4	31,8	27,6	6,5	7,2	33,8	32,2
18.	9,1	3,8	4,7	21,2	17,3	0,9	1,2	27,6	26,2
19.	63,8	32,2	37,2	100,0	92,1	7,8	7,5	136,0	127,0
20.	33,4	12,4	13,2	48,0	42,3	5,3	5,3	54,2	52,0
21.	94,0	59,2	62,5	186,0	147,0	2,2	9,7	274,0	233,0
22.	34,0	13,5	14,6	58,0	52,1	2,2	3,8	62,2	60,4
23.	2,8								
24.	69,6	18,7	24,5	142,0	104,0	0,4	0,9	149,0	145,0
25.	92,5	34,7	38,8	139,0	135,0	0,6	1,9	157,0	156,0
26.	30,0	13,1	16,3	51,5	57,9	2,5	2,5	64,8	62,3
27.	3,6	0,6	0,9	9,4	8,7	0	0	11,3	9,4
28.	42,4	6,9	10,6	104,0	96,0	1,9	1,6	122,0	108,0
29.	13,4	7,1	5,0	27,6	21,9	0,9	0,9	26,0	25,9
30.	112,0	41,6	50,2	149,0	138,0	1,6	1,7	173,0	165,0
M	49,1	20,1	24,4	83,5	72,1	2,6	4,2	102,4	96,4

	NATIV	1000 ÜR	1000 ÜF	1000 SR	1000 SF	5000 ÜR	5000 ÜF	5000 SR	5000 SF		
1.											
2.	100										
3.	100										
4.	100										
5.	100										
6.	100										
7.	100										
8.	100										
		100	37,2	44,6	185,2	162,2	5,7	7,6	222,7	206,7	M
10.	100	49	61	154	138	3	16	195	188		
11.	100	53	64	155	135	8	9	200	190		
12.	100	34	39	179	137	2	3	219	215		
13.	100	58	82	256	195	4	6	282	237		
14.	100	66	74	170	141	5	5	233	207		
15.	100	0	0	211	177	0	0	244	244		
16.	100	13	13	213	200	0	0	240	213		
17.	100	36	37	140	122	28	31	149	142		
18.	100	41	51	232	190	9	13	303	287		
19.	100	50	58	156	144	12	11	213	199		
20.	100	37	39	143	126	15	15	162	155		
21.	100	62	66	197	156	2	10	291	247		
22.	100	39	42	170	153	6	11	182	177		
23.	100										
24.	100	26	35	204	149	1	1	214	208		
25.	100	37	41	150	145	1	2	169	168		
26.	100	43	54	171	193	8	8	216	207		
27.	100	16	25	261	236	0	0	313	261		
28.	100	11	25	245	226	2	3	287	154		
29.	100	36	42	162	154	6	6	188	187		
30.	100	37	44	132	123	1	1	154	147		

Bei Zentrifugation mit 1000 U./min. verhalten sich Überstand und Sediment der formalin- und ringerbehandelten Proben konträr.

Im Überstand zeigen die formalinbehandelten Proben eine größere Dichte, im Sediment dagegen die mit Ringerlösung behandelten Proben.

Das gleiche Verhalten ist bei Zentrifugation mit 3000 U./min. festzustellen. Das bedeutet, daß durch die Eigenmotilität der Spermatozoen eine größere Konzentrierung im Sediment bewirkt wird. Die Spermatozoen weisen im Zentrifugationsfeld unabhängig von der Zahl der Umdrehungen einen positiven Geotropismus auf.

Hinsichtlich der vorgegebenen Konzentrationen wurden drei Klassen gebildet:

- a) Ausgangskonzentrationen von 0,1 - 20,0 Mill. Spermatozoen pro Milliliter.
- b) Ausgangskonzentrationen von 20,1 - 40,0 Mill./ml
- c) Ausgangskonzentrationen von 40,1 - 161,0 Mill./ml

Hierbei wurden folgende Ergebnisse ermittelt:

Siehe Seite 26.

Zu a)

	NATIV	1000 ÜR	1000 ÜF	1000 SR	1000 SF	3000 ÜR	3000 ÜF	3000 SR	3000 SF
13	100	58	82	256	195	4	6	282	237
14	100	66	74	170	141	5	5	233	207
15	100	0	0	211	177	0	0	244	244
16	100	13	13	213	200	0	0	240	213
18	100	41	51	232	190	9	13	303	287
27	100	16	25	261	236	0	0	313	261
29	100	36	42	163	158	6	6	188	187
M	100	32,9	41	215,1	185,3	3,4	4,3	257,6	233,7

Zu b)

	NATIV	1000 ÜR	1000 ÜF	1000 SR	1000 SF	3000 ÜR	3000 ÜF	3000 SR	3000 SF
17	100	36	37	140	122	28	31	149	142
20	100	37	39	143	126	15	15	162	155
22	100	39	42	170	153	6	11	182	177
26	100	43	54	171	193	8	8	216	207
M	100	38,8	43	156	148,5	14,3	16,3	177,3	170,3

Zu c) - siehe Seite 27.

Zu c)

	NATIV	1000 ÜR	1000 ÜF	1000 SR	1000 SF	3000 ÜR	3000 ÜF	3000 SR	3000 SF
10	100	49	61	154	138	3	16	195	188
11	100	53	64	155	135	8	9	200	190
12	100	34	39	179	137	2	3	219	215
19	100	50	58	156	144	12	11	213	199
21	100	62	66	157	156	2	10	291	247
24	100	26	35	204	194	1	1	214	208
25	100	37	41	150	145	1	2	169	168
28	100	11	25	245	226	2	3	287	254
30	100	37	44	133	123	1	1	154	147
M	100	39,9	48,1	174,8	155,3	3,6	6,2	215,8	201,8

Bedeutung:

Der Sedimentationseffekt zeigt sich am deutlichsten in der Klasse der eingeschränkten Spermatozoenkonzentrationen, was mit den Ergebnissen der Motilität übereinstimmt.

5. STATISTIK

In einem ersten Schritt soll der FRIEDMANN-Test für k-verbundene Stichproben Auskunft darüber geben, ob Unterschiede zwischen den einzelnen Meßreihen bestehen, die nicht zufälliger, sondern signifikanter Natur sind.

FRIEDMANN-Test

Die Nullhypothese nimmt an, daß sämtliche Meßreihen aus der gleichen Grundgesamtheit stammen und es wird untersucht, ob das gegebne Zahlenmaterial davon signifikant abweicht.

Dazu werden in der jeweils gegebenen Tafel die Meßwerte innerhalb einer Zeile durch Rangzahlen ersetzt, d.h. z.B. der viertgrößte Wert innerhalb einer Zeile durch die Zahl 4. Bei Gleichheit mehrerer Werte innerhalb einer Zeile werden die Rangzahlen gemittelt. Anschließend erhält man durch Summation über die j-te Spalte der Tafel die Rangsummen R_j , die ja gemäß der Nullhypothese angenähert gleich groß sein müßten.

Die Testgröße ist angenähert χ^2 -verteilt mit $k - 1$ Freiheitsgraden. Die Signifikanzniveaus erhält man aus einschlägigen Tafelwerken.

$$\chi^2_r = \frac{12}{Nk(k+1)} \sum_{j=1}^k (R_j)^2 - 3N(k+1)$$

N = Zeilenzahl

k = Spaltenzahl

R_j = Rangsumme der j-ten Spalte

Die Auswertung der Motilität ergab bei vier Freiheitsgraden eine signifikante Verschiedenheit der einzelnen Meßreihen auf dem 1 %-Niveau.

Bei acht Freiheitsgraden ergaben die Meßreihen der Konzentration ebenfalls signifikante Unterschiede auf dem 1 %-Niveau.

Damit ist also gezeigt, daß signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Meßreihen vorhanden sind. Im nächsten Schritt wollen wir nun feststellen zwischen welchen Meßreihen.

In diesem Fall scheint es am günstigsten zu sein, eine mehrfache Anwendung des Vorzeichentests für zwei verbundene Stichproben durchzuführen. Dabei ist jedoch zu beachten, daß sich Fehlerwahrscheinlichkeiten aufaddieren, d.h. die Signifikanzschranken müssen sehr hoch angesetzt werden. Das hat wiederum den Nachteil, daß die Fehler 2. Art, d.h. Homogenitätsaussagen zwischen zwei Meßreihen von einem großen Fehler behaftet sind. Wir beschränken uns daher auf die Sicherung signifikanter Unterschiede.

VORZEICHENTEST

Die Nullhypothese nimmt an, daß die beiden Meßreihen (X_A , X_B) aus der gleichen Grundgesamtheit stammen, d.h. die Wahrscheinlichkeit, daß $X_A > X_B$ ist dieselbe wie für $X_A < X_B$.

Zieht man nun die beiden Meßreihen voneinander ab, und betrachtet nur die Vorzeichen (+, -) des Ergebnisses (unter Streichung der Nullen), so ist die Summe der Vorzeichen binominal verteilt ($p = 1/2$) und somit können über diese Summen wieder signifikante Abweichungen festgestellt werden.

a) Auswertung Motilität:

Vergleich Motilität nativ: 1000 Sediment
ergibt 6 + bei 30 Versuchen (1 Null), d.h. die Wahrscheinlichkeit unter der Nullhypothese dieses bzw. ein noch extremeres Ergebnis zu erhalten, beträgt:

$$\sum_{p=0}^6 \binom{29}{p} \frac{1}{2^{29}} = 0,001157$$

Also unterscheiden sich die beiden Meßreihen signifikant (Signifikanzniveau 1 %).

Vergleich Motilität nativ: 3000 Sediment und 1000 Sediment: 3000 Sediment ergeben bei 30 Versuchen 0 -, d.h. unterscheiden sich jeweils signifikant mit einem Signifikanzniveau von 2^{-30} .

b) Auswertung Konzentration:

1000 Überstand Ringer: 1000 Überstand Formalin
ergibt bei 20 Versuchen 0 + (2 Nullen), also signifikant mit dem Signifikanzniveau 2^{-18} .

1000 Sediment Ringer: 1000 Sediment Formalin
ergibt 0 + bei 20 Versuchen, also beträgt die Signifikanzschranke 2^{-20} .

3000 Überstand Ringer: 3000 Überstand Formalin
zeigt eine Signifikanzschranke von 2^{-13} bei 20 Versuchen (7 Nullen).

3000 Sediment Ringer: 3000 Sediment Formalin
ergibt ein Signifikanzniveau von 2^{-19} bei 0 -
(1 Null) bei 20 Versuchen.

1000 Sediment Ringer: 3000 Sediment Ringer und
1000 Sediment Formalin: 3000 Sediment Formalin
zeigen ein Signifikanzniveau von 6 %.

Insgesamt betrachtet liegt also die Fehlerwahr-
scheinlichkeit in zwei Fällen kleiner als 6 %,
in allen übrigen Fällen unter 1 %.

6. DISKUSSION

Spermatozoen können bei Zentrifugation mit hohen Umlaufgeschwindigkeiten geschädigt werden. Das prägt sich deutlich im Motilitätsverlust aus. Untersucht man die Spermaproben nach Zentrifugation getrennt nach Überstand und Sediment, zeigt sich eine bedeutend größere Schädigung in der Überstandsfraction. Da in der Überstandsfraction die Spermatozoen nicht vergleichbar dicht gelagert sind wie in der Sedimentfraction, hätte man zunächst ein anderes Ergebnis erwarten dürfen. Die Erklärung dürfte jedoch in der gegenüber der Ausgangskonzentration erheblichen Dilution zu sehen sein, die eine weitere Schädigung bedingt.

Dieser Schädigungseffekt bei hohen Umlaufgeschwindigkeiten ist von mehreren Autoren beschrieben worden (siehe T.H. MANN). Wenig ist jedoch bekannt über das Verhalten der Spermatozoen bei niederen Umlaufgeschwindigkeiten. Ein erster Hinweis war von BRANHAM gegeben worden, der bei Seeigelspermatozoen eine größere Konzentrierung im Sediment nach Zentrifugation mit geringen Umlaufgeschwindigkeiten gefunden hatte und aus einem Vergleich formalinimmobilisierter Spermatozoen mit den Nativspermatozoen schließen konnte, daß in der Eigenmotilität der Spermatozoen ein Faktor der Konzentrierung motiler Spermatozoen im Sediment gesehen werden muß. Das bedeutet, daß motile Spermatozoen einen positiven Geotropismus im Zentrifugationsfeld entfalten, sie bewegen sich in das Sediment hinein. Im Überstand sind dagegen die weniger motilen Spermatozoen, die zudem durch die Dilution zusätzlich geschädigt wurden.

Diese Beobachtungen BRANHAMS sind bei menschlichen Spermatozoen erstmals von BODENSTEIN und HOFMANN überprüft worden. Die Autoren konnten nachweisen, daß mit der Zentrifugierung bis 1500 U./min. nicht nur eine Konzentrierung eintritt, sondern sich auch bessere Motilitäten nachweisen lassen.

Die vorliegende Arbeit hatte sich zum Thema gestellt, die Grundlagen dieses Phänomens experimentell zu analysieren. Dabei wurde auf die Versuchsanordnung von BRANHAM zurückgegriffen. Es ließ sich mit statistischer Signifikanz aufzeigen, daß zwischen Nativspermproben und formalinimmobilisierten Spermatozoen im Sediment mit 1000 und 3000 U./min. eine bessere Konzentrierung der Nativspermproben vorlag, d.h. daß die Eigenmotilität diese Konzentrierung mitbedingte. Umgekehrt war das Verhalten im Überstand:

Hier fanden sich mehr Spermatozoen in den formalinimmobilisierten Proben, was ebenso mit statistischer Sicherheit ausgesagt werden konnte. Zur weiteren Analyse dieses Phänomens wurden Nativspermproben nach der Zentrifugation mit 1000 und 3000 U./min. in Überstand und Sediment hinsichtlich der Motilität untersucht. Dabei zeigte sich gegenüber der Ausgangsmotilität im Sediment nach 1000 U./min. eine eindeutig bessere Motilität, während nach 3000 U./min. eine ebenso eindeutige Verschlechterung vorlag. Die Schädigung im Überstand, die sowohl durch die Selektionierung als auch durch die zusätzliche Dilution bedingt war, prägte sich bei 3000 U./min. deutlicher aus.

Hinsichtlich der klinisch-spermatologischen Gegebenheiten wurde diese Versuchsanordnung unterteilt in die verschiedenen Klassen der vorgegebenen Spermatozoenkonzentrationen, in die vorgegebenen schlechten und normalen Motilitäten, sowie in normale und reduzierte Spermatozoenmorphologie.

In diesen Einteilungen zeigte sich der Zentrifugationseffekt bei langsamen Umlaufgeschwindigkeiten eher noch deutlicher bei eingeschränkter Spermatozoendichte, -motilität und -morphologie.

Die Selektionierung prägte sich in dieser Gruppe deutlicher aus, was die Bedeutung des Phänomens für die klinische Anwendung unterstreicht.

7. ZUSAMMENFASSUNG

- a) Spermazentrifugation mit langsamen Umlaufgeschwindigkeiten führt zu einer Konzentrierung der Spermatozoen im Sediment und zu einer verbesserten Motilität der Spermatozoen in dieser Fraktion.
- b) Bei höheren Umlaufgeschwindigkeiten tritt dagegen eine deutliche Verschlechterung aller Proben ein.
- c) Bei den Überstandsspermatozoen tritt bereits bei 1000 U./min. eine Motilitätsverschlechterung ein, die bei 3000 U./min. noch deutlicher war. Aus dem unterschiedlichen Verhalten bei reduzierten und normalen Ausgangskonzentrationen läßt sich folgern, daß die Zentrifugationsschädigung hiermit durch eine Dilutionsschädigung überlagert wird.
- d) Die Motilitätsverbesserung bei langsamen Umlaufgeschwindigkeiten ist durch eine Selektionierung aufgrund der Eigenmotilität der Spermatozoen bedingt. Bei Vergleich der formalinimmobilisierten mit den unbehandelten Proben wurde ein signifikanter Unterschied der Spermatozoenkonzentrationen im Sediment festgestellt:
Die Proben mit mobilen Spermatozoen weisen eine höhere Konzentration auf als die Proben mit immobilisierten Spermatozoen. Damit ist bewiesen, daß die Selektionierung durch die Eigenmotilität der Spermatozoen herbeigeführt wird.

- e) Für die praktische Medizin ergibt sich somit bei Anwendung der Spermazentrifugation mit langsamen Umlaufgeschwindigkeiten der positive Effekt einer Konzentrierung verbunden mit einer Motilitätsverbesserung.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. BISHOP, D.W.: Sperm motility.
Physiol. Rev. 42,
1 - 59, (1962)
2. BODENSTEIN, J.: Untersuchungen zur
Spermazentrifugation
und anschließender
Kryoaufbereitung.
Inaug. Dissertation,
Erlangen 1974
3. BRANHAM, J.M.: A method of rating sea
urchin sperm motility.
Senescence of Arbacia sperm.
Biol. Bull. 127,
363 - 364, (1964)
4. BRANHAM, J.M.: Motility and aging of
Arbacia sperm.
Biol. Bull. 131,
251 - 260, (1966)
5. HARRISON, R.A.P.,
WHITE, J.G.: Some methods for washing
spermatozoa from bull, boar
and ram: a comparison using
biochemical and other criteria.
J. Reprod. Fert. 29,
271 - 284, (1972)

6. HOFMANN, N.,
BODENSTEIN, J.:
Einfluß der Spermien-
zentrifugation auf die
Qualität des Kryospermas.
In: Fortschritte der Fer-
tilitätsforschung, C.Schirren,
Vol. 3 S. 54 - 56
Berlin, Grosse Verlag 1974
7. MANN, T.:
The Biochemistry of semen
and of the male Reproductive
tract.
London, (1964)
8. NELSON, L.:
Sperm Motility.
In: Fertilization
Metz, C.B. and A. Monroe, Vol. 1
New York. Academic Press 1967
9. SCHIRREN, C.:
Praktische Andrologie
Berlin, Brüder Hartmann 1971
10. SILLO-SEIDL, G.:
Treatment of Oligospermia by
freezing and concentrating
semen.
Int. J. Fertil. 17,
183 - 184, (1972)

11. STUART, H.A.:

Kurzes Lehrbuch der Physik
Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York
1966

12. WESTPHAL, W.H.:

Physik
Ein Lehrbuch. 25./26. Auflage,
Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York
1970

Lebenslauf

Ich, Rudolf Dorn, wurde am 15. Februar 1950 in Amberg/Oberpfalz geboren. Mein Vater war Diplomkaufmann Adolf Dorn. Er starb im März 1975. Meine Mutter ist Steuerbevollmächtigte Luise Dorn, geborene Müller.

Nach der Grundschulzeit in Amberg wurde ich 1960 in das Erasmus-Gymnasium Amberg aufgenommen.

1966 wechselte ich an das Hanns-Seidel-Gymnasium in Amberg, wo ich 1969 die Reifeprüfung abgelegt habe.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen.

Mein Vorphysikum bestand ich im 16. November 1970 mein Physikum im 5. August 1972.

Während meines klinischen Studiums nahm ich eine Doktorarbeit an der Dermatologischen Klinik der Universität in Erlangen an.

Das medizinische Staatsexamen beendete ich am 29. Januar 1976.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197